

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.001

· 基础研究 ·

构建一种受 hTERT 启动子和 miR-145 双调控的更为安全的
新型溶瘤腺病毒*王荣花 韦 芳 李惠明 胡 冉 王慧萍[△]

(上海交通大学附属第一人民医院实验中心 上海 200080)

摘要 目的:构建一种受人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子和 miR-145 双调控的更加安全的条件复制型腺病毒。方法:在已构建的 hTERT 启动子调控早期复制必需基因 E1A 的条件复制型腺病毒 Adzq11 基础上,再将四个拷贝的 miR-145 的靶序列加入到 E1A 的 3' 非翻译区,构建新型溶瘤腺病毒 Adzq11-145T。应用 Real-time PCR 测定人非小细胞肺癌细胞 A549 和人胚肺成纤维细胞 HLF 中 miR-145 的表达量;然后在这两株细胞中,分别转染 Adzq11 和 Adzq11-145T 对应的穿梭质粒及感染病毒本身,用 Real-time PCR 检测 E1A 表达量以测定调控效果;用病毒空斑单位法检测两种病毒的复制情况;用 CCK8 检测对 A549 和 HLF 细胞的杀伤作用。结果:构建的新型溶瘤腺病毒 Adzq11-145T 在 HLF 中复制量明显低于 Adzq11,其 E1A mRNA 水平和杀伤效应也显著降低。而在 A549 中,Adzq11-145T 在 E1A 表达、病毒复制和溶瘤能力方面较 Adzq11 均无显著降低。结论:成功构建出一种新的受转录和转录后水平双重调控的条件复制型腺病毒 Adzq11-145T,它比仅加入 hTERT 启动子调控早期复制必需基因 E1A 的腺病毒 Adzq11 更加安全。

关键词:人端粒酶启动子;安全性;miR-145;溶瘤腺病毒

中图分类号:Q78;R734.2;R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6801-06

Construction of a Further Safer Conditional Replicating Adenovirus
Controlled by hTERT Promoter and miR-145-regulated System*WANG Rong-hua, WEI Fang, LI Hui-ming, HU Ran, WANG Hui-ping[△]

(Experimental Research Center, First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To construct a safer type of conditional replicating adenovirus controlled by human telomerase reverse transcriptase(hTERT) promoter and miR-145-regulated system. **Methods:** Based on oncolytic adenovirus Adzq11, whose replication was controlled by E1A gene located downstream of tumor-specific hTERT promoter, we inserted four copies of miR-145 complementary sequences into the 3'-untranslated region of the E1A gene to construct a novel oncolytic adenovirus Adzq11-145T. The miR-145 expression level in A549 and HLF was detected by using real-time RT-PCR. The E1A mRNA levels post viral infected and plasmid transfected were determined by real-time RT-PCR. Adenovirus cytotoxicity assay was performed by cell counting kit (CCK8). The viral titration was detected by Plaque Assay. **Results:** In normal cell HLF, the E1A mRNA levels, the lysis activity and the replication capacity of Adzq11-145T were less significant than those of Adzq11, while didn't reduced in tumor cell A549. **Conclusion:** Compared to oncolytic adenovirus Adzq11 controlled by hTERT promoter only, the novel oncolytic adenovirus Adzq11-145T, double controlled by hTERT promoter and miR-145, showed improved safety profiles.

Key words: Human telomerase reverse transcriptase(hTERT); Safety; miR-145; Oncolytic adenovirus

Chinese Library Classification: Q78; R734.2; R730.231 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6801-06

前言

肺癌是癌症死亡的最主要原因之一,每年全世界大约有一百万人由于肺癌死亡^[1]。很多患者在确诊时候已属晚期,只能采用放疗或者化疗的方式,但是治疗效果却不太理想^[2]。许多科学

家试图寻找另外的方式去治疗癌症,生物治疗是继手术、放疗、化疗三大传统疗法之后的第四种疗法,主要包括了免疫治疗、细胞治疗与基因治疗等,通过干扰肿瘤细胞的发生、生长、分化、凋亡、侵袭、转移和复发达达到治疗目的。肿瘤生物治疗的研发与应用已经取得很多成果^[3,4]。其中,条件复制型腺病毒可以

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30672440);上海市科委创新行动(13140902802)

作者简介:王荣花(1989-),女,硕士研究生,主要从事肿瘤基因治疗方面研究, E-mail:wangronghua2009@126.com

[△] 通讯作者:王慧萍, E-mail:tywhp9618@msn.com

(收稿日期:2014-06-30 接受日期:2014-07-22)

在肿瘤细胞内选择性的复制,而且具有显著的“溶瘤效应”和“旁观者效应”,因而作为一种新兴方式被期望在晚期癌症的治疗中发挥作用^[9]。目前最常用的构建条件复制型腺病毒的手段是利用人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控腺病毒早期复制必需基因(E1A),实现其仅在肿瘤细胞内特异性复制和溶瘤的作用,保证其治疗效应的安全性及有效性。然而,必须清楚地认识到,这种安全性是相对的,尤其在高浓度病毒剂量的使用下,仍会产生比较严重的毒副作用,Kumiko Sugio等^[6]用人端粒酶启动子调控 E1A 早期复制的腺病毒 TRAD 以 10 MOI 和 2 MOI 剂量分别感染人肺成纤维细胞 WI38,结果发现,在 2 MOI 小剂量情况下,病毒复制量很少,而在 10 MOI 剂量下,病毒复制量有 500 倍的增加;John Nemunaitis 得出同样的结果^[7]。究其原因,均为腺病毒 E1A 基因的表达不够严谨所导致。如果能够在 E1A mRNA 的翻译水平可根据细胞不同活性进行更精细地调控,使其 E1A 基因表达经转录水平和转录后水平双重调控,则构建的这种新型条件复制型腺病毒,其严谨性必应得以增强,更为安全。近年来,MicroRNA 是一类研究透彻的转录后基因表达调控分子,在肿瘤细胞和正常细胞中存在差异表达。它们是内源表达的小编码 RNAs,通常只有 18-25 个核苷酸长度,是转录后基因表达的重要调控子,通过形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC,RNA-induced silencing complex),和目的 mRNA 部分碱基完全互补配对结合,沉默靶基因^[8-12]。miR-145 是其中研究众多、也最为清楚的 microRNA,在很多肿瘤中包括结肠癌、肺癌、胃癌、卵巢癌组织和细胞系中表达量是低的,而在它们的正常细胞中表达量较高^[13,14]。本实验室曾成功构建了一个人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控腺病毒复制早期必需基因 E1A 的腺病毒 Adzq11,能很好地在肿瘤细胞内选择性复制^[15]。本次实验,我们以 Adzq11 为基础,利用 miR-145 存在肿瘤组织和正常组织差异表达这一特点,设计了四个拷贝的靶序列,加入腺病毒 Adzq11 早期复制必需基因 E1A 的 3' 非翻译区,构建了新病毒 Adzq11-145T。在 miR-145 低活性的肺癌细胞 A549 和 miR-145 高活性的人胚肺成纤维细胞 HLF 中,我们分别观察比较了 Adzq11 和 Adzq11-145T 病毒 E1A 的表达水平、复制能力和杀伤效率,验证 Adzq11-145T 经转录水平和转录后水平双重调控后安全性是否得到提高,为肺癌的治疗提供一个新思路。

1 材料和方法

1.1 质粒,细胞和仪器

pDC311-telo-E1A 载体和 pBHGloxp(携带 GFP 基因)由本实验室构建保存;腺病毒 E1 区转化人胚肾细胞 AD-293 购自 Stratagene 公司;A549 与 HLF 均保存于本实验室液氮罐;DMEM 培养基和 DMEM/F12 培养基购自于 Hyclone;胎牛血清购自 Gibco BRL 公司;青霉素溶液(青霉素 10000 U/ml,链霉素 10000 μg/ml)购于 Hyclone 公司;限制性内切酶 *PmeI* 和 *HpaI* 购自 Biolabs;其他限制性内切酶和 T4DNA 连接酶均购买自大连宝生物 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶购自 Thermo 公司;转染试剂 lipofectamin2000 购买于 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒购买自 TaKaRa;SYBR® Premix Ex Taq™ 购自于 TAKARA 公

司;Seaplaque™ 低温溶胶购买于 Cambrex Bio Science Rockland 公司;miR-145 检测试剂盒购于广州锐博生物公司;CCK-8 assay Kit 购自于 DOJINDO 公司。实验主要使用仪器有:PCR 扩增仪(PTC-150,PTC-200,MJ Research 公司);Eppendorf Centrifuge 5417c 型、5810R 型离心机(Eppendorf 公司);紫外分光光度计(Ultrospec3000,Pharmacia Biotech 公司);倒置荧光相差显微镜(ZEISS 公司)。

1.2 腺病毒穿梭质粒的构建和腺病毒的包装

1.2.1 腺病毒穿梭质粒 pDC311-telo-E1A-145T 的构建 在数据库 mirbase 查询 miR-145 的序列 guccaguuuucccaggaaucuccu。据此设计并合成四个 miR-145 的靶序列(S-145T)gt-taacaggattctctgggaaaactggactcagagggattctctgggaaaact ggacctgaagg gattctctgggaaaactggactaggaggattctctgggaaaactggacgtt(南京金斯瑞生物公司),将装有合成序列的 pUC57 载体穿刺菌,在 LB 培养基中 37℃ 培养过夜。提取并纯化质粒,经 *HpaI* 和 *PmeI* 酶切后胶回收片段 S-145T。将载体 pE1A 经 *NotI* 酶切开,然后用 pfu 酶补齐,与 S-145T 片段经 T4 连接酶连接,挑取阳性克隆 pDC311-telo-E1A-145T,抽提质粒送上海生工生物公司测序,构建过程见图 1a。

1.2.2 条件复制型腺病毒的包装 将 293 细胞铺到 6 孔板进行培养,接种 1×10^5 孔,第二天细胞生长汇合度达到 80%-90% 左右。用脂质体 lipofectamine2000 将穿梭质粒 pDC311-telo-E1A、pDC311-telo-E1A-145T 和腺病毒的骨架质粒 pBH-Gloxp 共转染,于 37℃、5% CO₂ 培养。继续培养 5-7 天后可观察到病毒空斑出现,于镜下观察拍照。待病变空斑扩大,于 800 rpm 离心 5 min 收集所有病变细胞,以少量上清悬浮后反复冻融三次,12000 rpm 离心 10 min,上清即为初次收获得的病毒液体,于 -80℃ 保存。

1.3 细胞的培养与 miR-145 表达量的检测

1.3.1 细胞培养 A549 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养。AD293 和 HLF 细胞在 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养。上述培养基均添加终浓度为 100 U/ml 的青霉素和终浓度为 0.1 mg/mL 的链霉素。

1.3.2 miR-145 表达量检测 miR-145 检测试剂盒采用颈环法 microRNARTQ-PCR 进行测定^[11]。收取两株细胞的 RNA 提取并定量 2 μg。首先通过 miR-145 特定的逆转录引物 5-CT-CAACTGGTGTCTGGAGTCGCAATTCAGTTGAGAGGGA TTC-3 将 2 μg RNA 进行特异的逆转录,42℃ 60 min,70℃ 10 min;接下来通过特定的 miR-145 的正向引物 5-A-CACTCCAGCTGGGGTCCAGTTTCCAGGA-3 和统一反向引物 5-TGGTGTCTGGAGTCG-3 进行 QPCR 反应。内参 U6 的正向引物为 5-CTCGCTTCGGCAGCAC-3;反向引物为 5-AACGCTTACGAATTTGCGT-3;使用标准的三步法进行检测,设定程序:起始模板预变性:95℃ 20 sec;PCR 模板变性:95℃ 10 sec;退火 60℃ 20 sec;延伸:70℃ 5 sec,从 PCR 模板变性开始 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算结果,通过外标法对加入的初始 RNA 的量进行校正。每个结果都独立重复三次得到的平均值 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作图。

1.4 质粒转染与腺病毒早期复制必需基因 E1A 的检测

将 A549 细胞和 HLF 细胞分别以 1×10^5 孔铺板接种于 24 孔板中各三个孔,转染质粒 pDC311-telo-E1A 或 pDC311-telo-E1A-145T,以 lipofectamin2000 为空白对照。转染后 6 小时换液,转染后 48 小时用 trizol 收 RNA。提取 RNA 并定量 1 μ g RNA。用 TaKaRa 的去基因组逆转录试剂盒逆转录成 cDNA 后,采用 realtime-PCR 方法(SYBR 荧光染料)进行 E1A 定量表达。E1A 上游引物为 5-tcc ggt cct tct aac aca cc-3, 下游引物为 5-ggc gtt tac agc tca agt cc-3。hGAPDH 上游引物为 5-agaag-gctgggctcatttg-3, 下游引物为 5-aggggccatccacagtcttc-3(合成于上海生工生物)。以细胞内 hGAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 定量。

1.5 病毒水平检测腺病毒早期复制必需基因 E1A

A549 和 HLF 分别以 1×10^5 孔铺板与 24 孔板中,每种细胞 2 个孔。每种细胞的两个孔分别加入 Adzq11 和 Adzq11-145T 5 MOI。48 小时后用 trizol 收集 RNA,提取 RNA 并且定量 1 μ g。用 TaKaRa 的去基因组逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,用 SYBR 法进行 realtime-PCR 反应,方法同上。

1.6 病毒滴度测定

1.6.1 病毒感染细胞后收取病毒液 将 A549 和 HLF 分别以 1×10^5 孔铺板与 24 孔板中,每种细胞 8 个孔。两种病毒以每四个孔加入 5 MOI 的一种病毒的方式加入,10 小时后洗板,在 72h 收下感染病毒的细胞并控制体积都在 1 mL。

1.6.2 病毒空斑单位法测定病毒滴度 采用病毒空斑单位法(plaque forming unit, PFU)测定腺病毒的滴度。铺板早代 293 细胞于 24 孔板中以每孔 1×10^5 。待第二天细胞长至 90% 左右,将上述待测定浓度的病毒液按 10 倍稀释,每孔取 10^{-2} 至 10^{-7} 梯

度稀释液 250 μ L 感染 293 细胞。感染 5 小时后弃去液体培养基,补充含有 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基和 0.6% SeaplaqueTM 溶解胶东状混合物,继续培养 7 天,于显微镜下计数每个孔的病毒空斑数,该数目乘以该孔的稀释倍数即为细胞中病毒的滴度。

1.7 细胞 CCK-8 实验

两种细胞铺板于 96 孔板培养 24 小时后,病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 分别以 1, 5, 25 MOI 三种不同浓度加入细胞中,以无病毒组为对照,均设 4 个复孔。48 小时后,更换为 6% CCK8 试剂的新鲜培养基,孵育 60 min,在酶标仪上测量 450 nm 处的吸光度。细胞存活率 = (实验组 A450 吸光度 - 空白组 A450 吸光度) / (对照组 A450 吸光度 - 空白组 A450 吸光度)。

1.8 统计学方法

采用两样本均数比较的 t 检验,应用 spss16.0 软件分析。P < 0.05 时被认为有统计学差异。实验数据由至少三次实验获得,以 mean, upper/lower limit 或 mean $\pm$ SD 表示。

2 结果

2.1 质粒构建、测序与腺病毒的包装

测序结果显示四个拷贝的 miR-145 靶序列已经成功插入到 pDC311-telo-E1A 的 E1A 3' 非翻译区(图 1c)。用构建好的质粒 pDC311-telo-E1A-145T 和 pDC311-telo-E1A 分别与在 E3 区含有增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的腺病毒骨架质粒 pBH-Gloxp 共转染 AD293 细胞,14 天后观察到病毒出毒的“彗星状”绿色荧光带,成功构建出病毒 Adzq11 和病毒 Adzq11-145T(图 1b)。

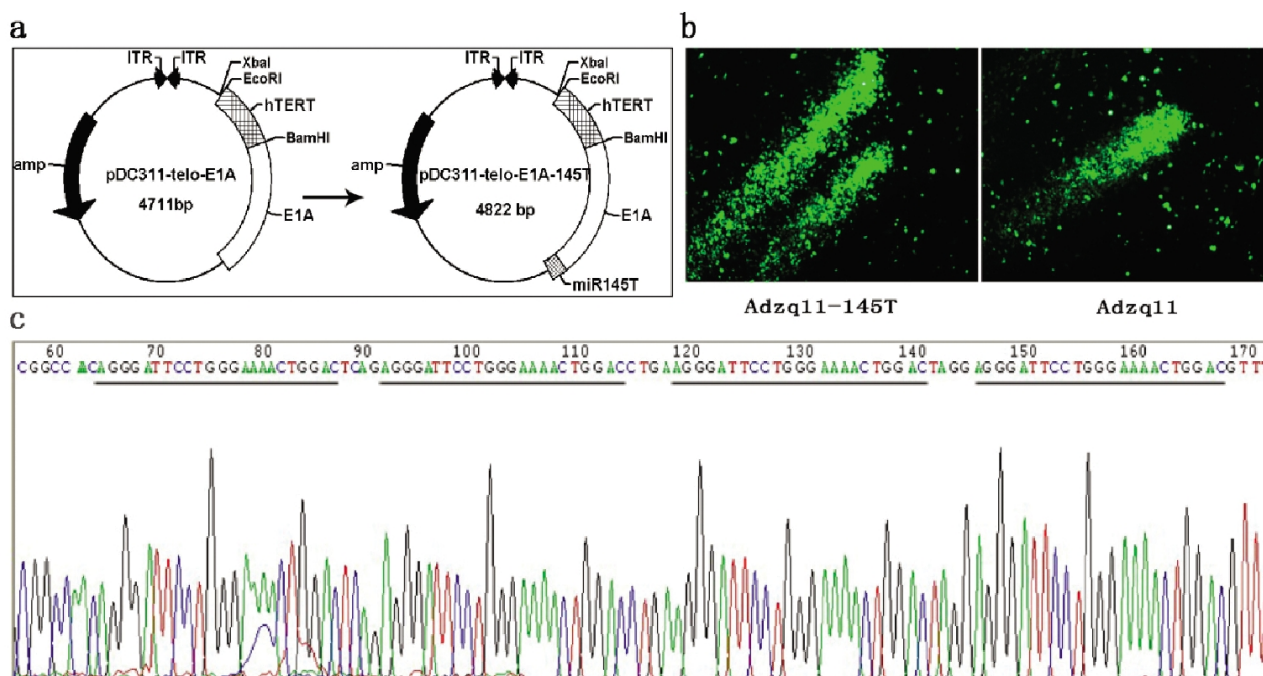


图 1 质粒构建,测序和腺病毒包装

Fig. 1 Construction of Plasmids and adenoviruses

图 1a 质粒的构建;图 1b 腺病毒包装出毒显示“彗星状”带;图 1c pDC311-telo-E1A-145T 质粒测序图

Fig. 1a The map of adenoviral shuttle vector; Fig. 1b Comet formation of adenoviruses; Fig. 1c The inserted DNA sequencing map of pDC311-telo-E1A-145T

2.2 miR-145 在 A549 和 HLF 细胞中的表达量

Real-time PCR 结果显示 miR-145 在 HLF 细胞中的表达量是内参基因 U6 的 1.492(1.697~1.312)倍,在 A549 细胞中表达量为内参基因的 0.517(0.626~0.428)倍。HLF 中 miR-145 表达量明显高于 A549 中,是 A549 表达量的 2.886 倍(3.065~2.711), $P=0.007$ (图 2a)。

2.3 miR-145 对 E1A 表达的调节

质粒 pDC311-telo-E1A 转染 A549 和 HLF 细胞,前者 E1A 表达量较后者有显著增加,与 A549 细胞中端粒酶逆转录酶活性高于 HLF 相关。

在 A549 细胞中,转染两种质粒 pDC311-telo-E1A 和 pDC311-telo-E1A-145T 后 E1A 水平差异较小,且后者 E1A 水

平并不比前者低。而在 HLF 中,pDC311-telo-E1A 质粒 E1A 表达水平为内参基因 hGAPDH 的 0.0042 (0.0048~0.0036) 倍, pDC311-telo-E1A-145T 质粒 E1A 表达水平显著下降,为 hGAPDH 的 0.0016 (0.0018~0.0015) 倍,仅为前者 0.381 倍(0.417~0.375), $P=0.008$ (图 2b)。

与转染质粒相似,病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 感染 A549 和 HLF 细胞后,A549 细胞中两种病毒的 E1A 表达量都较高;HLF 细胞中,Adzq11 病毒的 E1A 水平为内参基因的 0.285(0.307~0.265)倍,而 Adzq11-145T 病毒 E1A 表达显著下降,仅为内参基因的 0.066(0.084~0.050)倍,为前者的 0.232 (0.274~0.189)倍,有统计学差异(图 2c)。

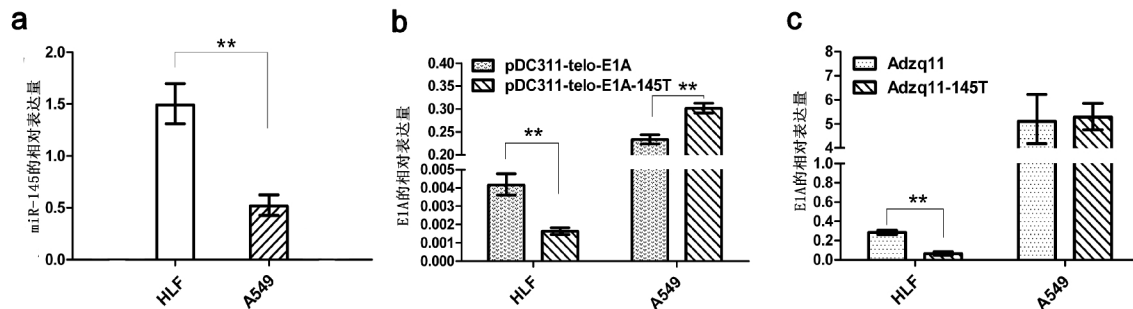


图 2 miR-145 和 E1A 在 A549 和 HLF 细胞中的表达

Fig. 2 Detection of miR-145 and E1A mRNA from A549 and HLF by RT-PCR

图 2a miR-145 的表达;图 2b 质粒 pDC311-telo-E1A 和 pDC311-telo-E1A-145T 转染细胞后 E1A 的表达;图 2c 病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 感染细胞后 E1A 的表达。* $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig. 2a Relative miR-145 expression in HLF and A549; Fig.2b Relative E1A expression level in pDC311-telo-E1A or pDC311-telo-E1A-145 Ttransfected cells; Fig.2c Relative E1A expression levels in Adzq11 or Adzq11-145T infected cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 病毒在 A549 和 HLF 细胞中复制情况比较

用病毒空斑单位法测定病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 在 A549 和 HLF 细胞中的复制情况。在 A549 中,Adzq11 复制量为 80 ± 20 (particle/cell),Adzq11-145T 复制量为 120 ± 81 (particle/cell),两者有统计学差异,Adzq11-145T 复制量高于

Adzq11;在 HLF 中,Adzq11 复制量为 0.16 ± 0.05 (particle/cell), Adzq11-145T 复制量为 0.10 ± 0.04 (particle/cell),Adzq11-145T 复制量明显低于 Adzq11,为 Adzq11 的 0.625(0.66~0.40)倍, $p=0.032$,有统计学差异(图 3a)。

2.5 病毒对 A549 和 HLF 细胞的杀伤作用比较

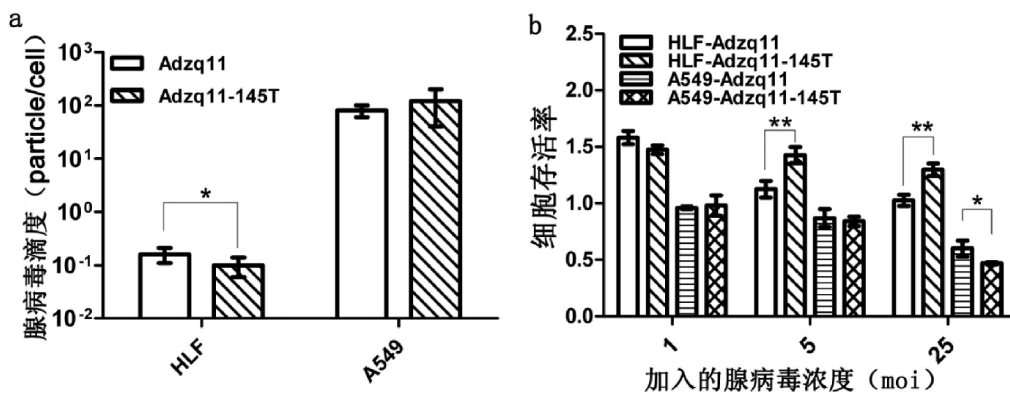


图 3 腺病毒复制和细胞毒性检测

Fig. 3 Detection of adenoviruses replication and cytotoxicity

图 3a 空斑单位法检测腺病毒在 A549 和 HLF 中的复制情况;图 3b 病毒对两种细胞的杀伤情况 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Fig. 3a Adenoviral replication capacity in A549 and HLF by plaque forming unit; Fig.3b Cytotoxicity of the adenoviruses to cells by CCK8 assay.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 分别以 1,5,25 MOI 感染 A549 和 HLF 细胞,48 小时后荧光拍照记录不同浓度下两种病毒的杀伤效果,加入 CCK8 试剂,测 A450 nm 的吸光度。

CCK8 结果显示:不同剂量组,Adzq11 对 A549 杀伤效应均明显强于 HLF;5,25 MOI 剂量的 Adzq11 对正常 HLF 产生了一定的杀伤,细胞存活率分别是 1.125 ± 0.074 和 1.026 ± 0.050 ,而同样剂量经改造后的 Adzq11-145T 对 HLF 的杀伤力减小,其细胞存活率分别为 1.426 ± 0.07 ($P < 0.01$) 和 1.298 ± 0.055

($P < 0.01$),较 Adzq11 更为安全。

同时荧光显微镜下可见,随着病毒浓度增大,病毒对细胞的杀伤效果都逐步增大。病毒 Adzq11 和 Adzq11-145T 对 A549 细胞均有杀伤且后者杀伤效果明显,胞体变圆,粘附力差。而在 HLF 细胞中,Adzq11-145T 感染后,所有细胞胞体呈长梭状,触角长,粘附牢;病毒 Adzq11 感染后,还可见存在部分变圆的、折光度稍差的病变细胞,细胞存活状态较 Adzq11-145T 差,与 CCK8 结果一致。

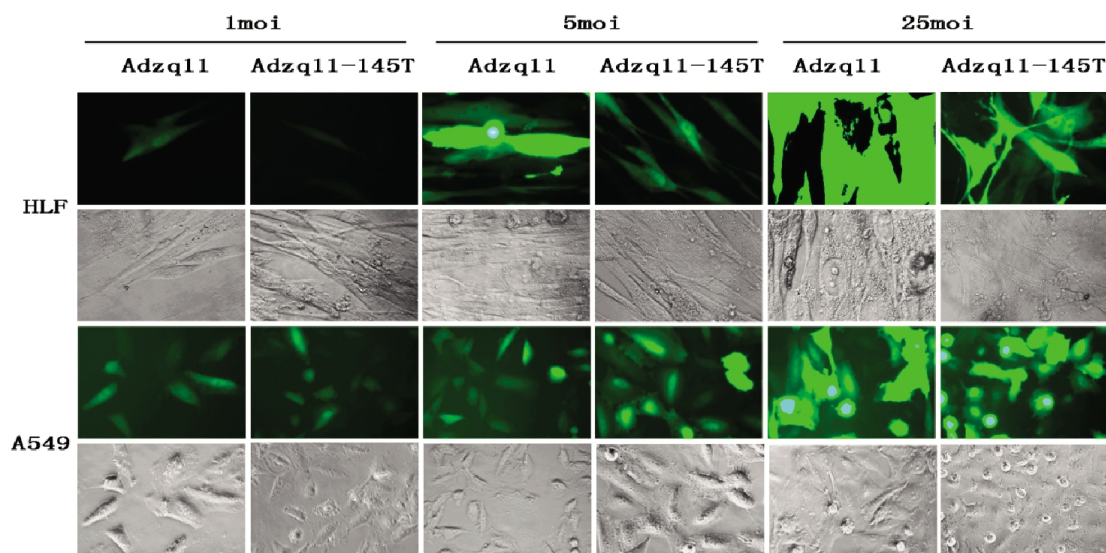


图 4 病毒感染 A549 和 HLF 细胞后病理改变

Fig. 4 Pathological changes of A549 and HLF infected with adenoviruses

3 讨论

基因治疗在肿瘤的治疗中发挥重要作用,而腺病毒是肿瘤基因治疗最常用的载体之一。以前出于安全性角度考虑,往往采用复制缺陷型腺病毒,但是由于会被机体免疫系统清除等原因治疗效果往往较差。溶瘤腺病毒因为“溶瘤效应”和“旁观者效应”被广泛应用,感染肿瘤细胞后,它可以自身复制产生更多的子代病毒,待肿瘤细胞裂解后,释放的子代病毒又可以再去感染其他肿瘤细胞,通过这种“感染-复制-裂解-再感染”的循环,从而放大肿瘤杀伤作用。然而,必须将这种溶瘤腺病毒的复制控制在肿瘤细胞内,以减少其对正常细胞的毒副作用,是其应用于肿瘤生物治疗所必备的主要前提。目前最常采用的手段是在转录水平使用一些特异性启动子来调控腺病毒复制早期必需基因 E1 的表达。我们先前已采用人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控 E1A 基因转录,构建溶瘤腺病毒 Adzq11,使其仅在具有高 hTERT 活性的肿瘤细胞中具有肿瘤特异性高效率复制能力。

但是,尽管有肿瘤特异的启动子调控保障,一些溶瘤腺病毒在大剂量使用情况下,在正常细胞中仍存在一定水平的复制,进而导致了很不乐观的细胞毒性,均归因于胞内低水平表达的 E1A。因此,在已有的病毒复制必需基因 E1A 转录受 hTERT 启动子调控的基础上,如果我们能够利用 MicroRNAs 转录后调控机制,构建新型的双调控溶瘤病毒,可能会提高该病毒的安全性。Jin Huajun 等^[15]利用 let-7 在肝癌组织中下调。

在 Ad5/11 的 E1A 的 3'UTR 分别加入 8 个拷贝的 let-7 靶序列及 let-7 靶序列的突变序列,构建了条件复制型腺病毒 SG7011let7T 和 SG7011let7MT。通过 western blotting 和 RT-PCR 检测 E1A 蛋白的表达,证明相对于 WAd5 和 SG7011let7MT,在正常肝脏细胞系 L-02 和正常胚胎肝脏细胞系 WRL-68 中 SG7011let7T 的复制被大量遏制,明显减轻了肝脏毒性。LiJhy-ming 等^[14]将四个拷贝 miR-145 靶序列加入疱疹病毒 HSV-1 的病毒复制必需基因 ICP27 的 3'UTR,在非小细胞肺癌的治疗中减弱对正常细胞的毒性。microRNA 转录后调控机制用来构建更加安全的溶瘤腺病毒是行之有效的。

MicroRNAs 是一些高度保守的内源性非编码 RNAs,通常只有 18-25 核苷酸长度。其通过和目标 mRNA 的 3' 非翻译区互补配对,来遏制目标基因的表达。有超过 800 多种 miRNAs 已被证实表达存在特异性,其中有些还具有差异性,即在正常组织细胞中高表达,而在肿瘤中低表达^[6,14,17,18,19],这其中包括 miR-143,miR-145,let-7a。本实验结果也显示,miR-145 在 A549 中表达较低,仅为 U6 的 0.517(0.626~0.428)倍;在 HLF 细胞中表达较高,可达 U6 的 1.492(1.697~1.312)倍(图 2a)。我们将 4 个 miR-145 拷贝靶序列串联后,装载入 E1A 基因 3' 非翻译区,构建了 Adzq11-145T。miR-145 可特异性与 E1A mRNA 分子所携带的 3' 尾端靶识别序列结合,通过引发形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC)而降解 E1A mRNA 分子,降低 E1A mRNA 水平。我们的实验结果证实,在 HLF 中 Adzq11-145T 显著降低了 E1AmRNA,是 Adzq11 组的 0.232(0.274~0.189)倍(图 2c);同

期,Adzq11-145T 比 Adzq11 复制能力更弱,仅为后者的 0.625 (0.66~0.40)倍(图 3a),有统计意义,说明双调控 Adzq11-145T 比 Adzq11 更加安全。而另一方面,我们也比较了此种改变对肺癌细胞 A549 的影响。研究结果显示,与 Adzq11 相比,Adzq11-145T E1A mRNA 水平无明显减低,甚至 Adzq11-145T 对应穿梭质粒 pDC311-telo-E1A-145T E1A mRNA 水平反而增高,Adzq11-145T 的复制能力也比 Adzq11 明显增高(图 2c,3a),推测可能是加入的 miR-145 靶序列结构对病毒 E1A 基因 mRNA 的稳定性产生了一定影响。经 The mfold Web Server 分析发现,插入的四个拷贝 miR-145 靶序列二级结构形成一较大的“颈环结构”(结果未展示),3' UTR 区的“颈环结构”可抵御核酸酶的剪切从而增加 mRNA 的稳定性^[20,21],E1A mRNA 稳定性的增加导致 E1A 蛋白量增加,从而促进病毒复制,产生更好的溶瘤效果。

在溶瘤方面,Adzq11-145T 对肿瘤细胞 A549 的杀伤效应也并不逊色于 Adzq11,甚至在 25 MOI 剂量下,显示出比 Adzq11 有更好的杀伤效果。正常细胞 HLF 中,随着病毒剂量增大,Adzq11 对其的杀伤作用逐步增大,而 Adzq11-145T 对 HLF 的杀伤作用较 Adzq11 则明显减弱(5 MOI 时,Adzq11 细胞存活率为 1.125 ± 0.074 , Adzq11-145T 细胞存活率 1.426 ± 0.07 ; 25 MOI 时,Adzq11 细胞存活率 1.026 ± 0.050 , Adzq11-145T 细胞存活率 1.298 ± 0.055),有统计意义(图 3b),与荧光显微镜观察结果(图 4)一致。

总之,Adzq11-145T 在安全性方面比对照病毒 Adzq11 的确有很大的进步,且并未影响其在肿瘤细胞中的优势特性。在转录水平和转录后水平共同调控腺病毒复制的方法是有效的,不仅有望在肺癌的治疗中,还在其他类型的肿瘤治疗中拥有巨大的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108
- [2] Keith R L, Miller Y E. Lung cancer: genetics of risk and advances in chemoprevention[J]. Curr Opin Pulm Med, 2005, 11(4): 265-271
- [3] 张艳, 魏文青. 生物治疗在肿瘤综合治疗中的作用 [J]. 医学综述, 2013, 9(19): 3507-3510
Zhang Yan, Wei Wen-qing. The role of biological therapy in the comprehensive treatment of tumors [J]. Medical recapitulate, 2013, 19(19): 3507-3510
- [4] 杜春娟, 曹水, 任秀宝. 生物治疗逆转肿瘤化疗耐药的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2011, 34(4): 248-250
Du Chun-juan, Cao Shui, Ren Xiu-bao. Biotherapy reverses chemotherapy resistance[J]. Int J Immunol, 2011, 34(4): 248-250
- [5] 韦芳, 王慧萍, 陈霞芳, 等. 加热调控的溶瘤腺病毒载体构建及其特征研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(12): 1536-1543
Wei Fang, Wang Hui-ping, Chen Xia-fang, et al. Construction and characterization of oncolytic adenovirus controlled under heat shock protein 70 gene promoter [J]. Prog. biochem. biophys, 2009, 36(12): 1536-1543
- [6] Sugio K, Sakurai F, Katayama K, et al. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(9): 2807-2818
- [7] Nemunaitis J, Tong A W, Nemunaitis M, et al. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors [J]. Mol Ther, 2010, 18(2): 429-434
- [8] Paranjape T, Slack F J, Weidhaas J B. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics[J]. Gut, 2009, 58(11): 1546-1554
- [9] Ylosmakie, Hakkarainen T, Hemminki A, et al. Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA [J]. J Virol, 2008, 82(22): 11009-11015
- [10] Cawood R, Wong S L, Di Y, et al. MicroRNA controlled adenovirus mediates anti-cancer efficacy without affecting endogenous microRNA activity [J]. PLoS One, 2011, 6(1): 1-10
- [11] 郭志伟, 钟照华. microRNA 的组织特异性表达及其检测方法[J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(5): 367-370
Guo Zhi-wei, Zhong Zhao-hua. Tissue specific expression of microRNA and detection methods [J]. Int J Immunol, 2010, 33(5): 367-370
- [12] 李广平, 邱长春. MicroRNAs 研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(12): 1893-1895
Li Guang-ping, Qiu Chang-chun. The current progress of microRNAs [J]. Progress in modern biomedicine, 2007, 7(12): 1893-1895
- [13] Iio A, Nakagawa Y, Hirata I, et al. Identification of non-coding RNAs embracing microRNA-143/145 cluster [J]. Mol Cancer, 2010, 9(136): 1-7
- [14] Li Jhy-ming, Kao Kuo-chin, Li Li-fu, et al. MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of human non-small cell lung cancer cells[J]. Virol J, 2013, 10(241): 1-9
- [15] Jin Hua-jun, Lv Sai-qun, Yang Jia-he, et al. Use of microRNA Let-7 to control the replication specificity of oncolytic adenovirus in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2011, 6(7): 1-10
- [16] Wang Hui-ping, Wei Fang, Zhang Ju-feng, et al. A novel immunocompetent murine tumor model for the evaluation of RCAd-enhanced RDAd transduction efficacy [J]. Tumour Biol, 2012, 33(4): 1245-1253
- [17] Edger E, Falls T J, Brown C W, et al. A let-7 MicroRNA-sensitive vesicular stomatitis virus demonstrates tumor-specific replication[J]. Mol Ther, 2008, 16(8): 1437-1443
- [18] Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex[J]. Science, 2002, 297(5589): 2056-2060
- [19] Leber M F, Bossow S, Leonard V H, et al. MicroRNA-sensitive oncolytic measles viruses for cancer-specific vector tropism [J]. Mol Ther, 2011, 19(6): 1097-1106
- [20] Anjums, Ali S, Ahmad T, et al. Sequence and structural analysis of 3' untranslated region of hepatitis C virus, genotype 3a, from Pakistani isolates[J]. Hepat Mon, 2013, 13(5): 1-7
- [21] Chen I H, Chu C H, Lin J W, et al. Maintaining the structural integrity of the Bamboo mosaic virus 3' untranslated region is necessary for retaining the catalytic constant for minus-strand RNA synthesis[J]. Virol J, 2013, 10(208): 1-10